

(11)特許出願公開番号

特開平8-211011

(43)公開日 平成8年(1996)8月20日

(51)Int.Cl. <sup>a</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 27/327				
C 1 2 M 1/34	B			
C 1 2 Q 1/00	B	6807-4B		

G 0 1 N 27/ 30 3 5 5  
27/ 46 3 0 1 G

審査請求 未請求 請求項の数5 OL (全 6 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平7-1790

(22)出願日 平成7年(1995)1月10日

特許法第30条第1項適用申請有り 1994年9月29日 社  
団法人日本分析化学会発行の「日本分析化学会第43年会  
講演要旨集」に発表

(71)出願人 592033404

建設省関東地方建設局長

東京都千代田区大手町1-3-1 大手町  
合同庁舎第一号館

(71)出願人 591086706

輕部 征夫

神奈川県川崎市宮前区東有馬1丁目3番地  
16

(71) 出願人 593156979

社団法人建設電気技術協会

東京都港区虎ノ門1丁目11番7号

(74) 代理人 弁護士 佐々木 功 (外1名)

最終頁に続く

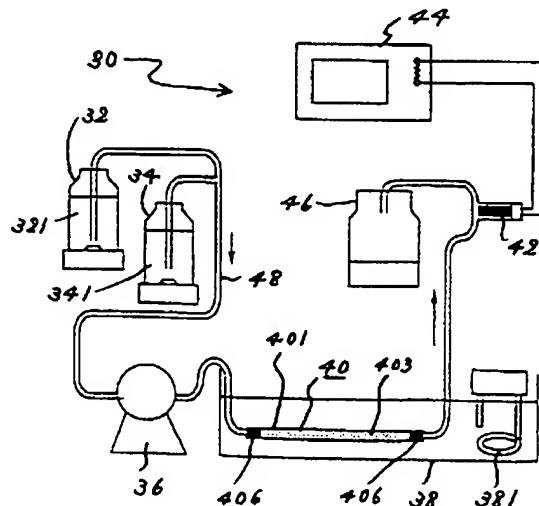
(54) 【発明の名称】 シアン分解微生物を用いるシアンバイオセンサー

(57) 【要約】

【目的】 シアン分解微生物を用いるシアンバイオセンサー、該センサーを用いるシアンの測定法及び測定システムを提供する。

【構成】 シュードモナス・フルオレッセンス (*Pseudomonas fluorescens*) NCIBM 11764 を固定化させた担体と酸素電極とを組み合わせたシアンセンサーである。上記の微生物はシアンを生分解して呼吸活性を特異的に向上させる特性を有しており、試料溶液中にシアンイオンが存在し且つ該溶液に上記の微生物が接触すれば、該試料溶液中の溶存酸素が減少するので、これを酸素電極により電流値の減少として捉え、試料溶液中のシアン濃度をシアン化カリウム濃度換算で測定する。

【効果】 シアン化カリウム濃度換算で 0.1 - 1.0ppm の範囲内で測定でき、全測定所要時間が約 3 分間以内であり、試料溶液の前処理も不要である。



## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 シュードモナス・フルオレッセンス (*Pseudomonas fluorescens*) NCIMB 11764 を固定化した担体が酸素電極と組み合わされていることを特徴とする、シアンバイオセンサー。

【請求項 2】 シュードモナス・フルオレッセンス NCIMB 11764 が担体に固定され、ガラス管内に充填されていることを特徴とする、請求項 1 に記載のシアンバイオセンサー。

【請求項 3】 担体がアルギン酸カルシウムゲルであることを特徴とする、請求項 1 又は 2 に記載のシアンバイオセンサー。

【請求項 4】 請求項 1 に記載のシアンバイオセンサーと、該シアンバイオセンサーを一定の温度に保つ恒温槽と、シアンバイオセンサーにおける酸素電極の電流を測定する電圧電流計と、測定された電流変化を記録するレコーダとを備えていることを特徴とする、シアン測定システム。

【請求項 5】 請求項 1 に記載のシアンバイオセンサーにおけるシュードモナス・フルオレッセンス NCIMB 11764 を固定化した担体に一定温度の緩衝液を導くと共に酸素電極を流れる電流を測定し、電流値が安定した時点でバイオシアンセンサに試料液を導いて酸素電極を流れる電流を測定し、電流の減少の割合から試料液中のシアン濃度を測定することを特徴とする、シアンの測定法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明はシアン分解微生物を用いるシアンバイオセンサー、該センサーを用いるシアンの測定法及び測定システムに係り、例えば河川等から採取された試料溶液を対象として該試料溶液中に溶存しているシアン濃度をシアン化カリウム濃度換算で測定するために使用される。

## 【0002】

【従来の技術】 シアンは猛毒であるために、その検出法として種々の方法が提案されている。一般に試料溶液中のシアン化物はシアンイオン ( $\text{CN}^-$ ) や安定度の異なるシアン錯体として混在しているために、前処理を行なう必要がある。即ち、pH 5.5 において  $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  の存在下で発生する HCN は、試料溶液の pH を酢酸により 5.5 とした後に蒸留法により HCN を分離させることにより前処理される。pH 5.0 で発生する HCN は、試料水の pH を 5.0 に調整し、40°C に加温することにより空気を通じて発生する HCN を NaOH により捕集することにより前処理される。pH 2 以下において発生する HCN は全シアンと称されており、これは試料溶液に  $\text{H}_3\text{PQ}$  を添加して pH を 2 以下となし、EDTA を添加して加熱蒸留することにより発生する HCN を NaOH により捕集することにより前処理される。上記のようにして前

処理された試料溶液中の  $\text{CN}^-$  は、通例、ピラゾロン法又は迅速ピラゾロン法により定量される。これらの定量法において、前者は  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{--KH}_2\text{PO}_4$  緩衝液、クロラミン T、発色試薬としての 1-フェニル-3-メチル-5-ピラゾロンとビス(1-フェニル-3-メチル-5-ピラゾロン)の混合溶液等を一定量の前処理済み試料水に添加し、波長 620nm 付近で吸光度を測定するものであり、後者も前者と同様の操作を行うものであり、但し発色試薬として 4-ピリジンカルボン酸-ピラゾロン溶液 (1-フェニル-3-メチル-5-ピラゾロンの N,N-ジメチルホルムアミド溶液と 4-ピリジンカルボン酸水溶液との混合物) を用いて波長 638nm 付近で吸光度を測定するものである。尚、前処理後の試料水の pH を 12-13 に調整して測定するイオン電極法もあり、又  $\text{CN}^-$  量の比較的多い場合 (3-11.0ppm) には pH 9-10 であってルミノール (3-アミノフタル酸ヒドラジド) を含有する銅 (II) アンミン試薬に上記濃度のシアンイオン含有試料を添加すると、銅 (II) アンミン錯体が銅 (I) シアン錯イオンに変化し、これによって溶液が藍青色から無色に変化し、サーモスタット内で、上記の溶液に過酸化水素液を添加して経時を開始すると t 秒後に溶液が再び藍青色に変化し、この場合にシアンイオン濃度と、再び藍青色となる迄の時間 (誘導期) の対数との間には直線的な関係があることを利用してシアンイオンの定量を行なう、所謂測時分析法もある。尚、検出感度を上昇させるために、シアンイオン選択性電極をセンサーとして用いる方法もある。この電極を用いてシアンを検出するためには、河川に流出したシアン化物が一般にシアン錯体の形態をなしていることが多いので、採取した試料溶液に紫外線を照射してシアン錯体を分解することにより HCN となし、ガス透過分離管及び過酸化鉛カラムに導いて測定妨害物質となる硫化物イオンを除去したガスの形態で上記のシアンイオン選択性電極に導き、電流・電圧信号に変換し、これを記録すると共にシアンイオン濃度を測定するものである。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題乃至発明の目的】 上記の一般的な従来のシアン検出法は、検出感度比較的良好であるが (ピラゾロン法の検出限界: 0.03ppm)、煩雑な前処理が要求され、更に前処理後の測定自体にも時間を要する点に課題があった。一方、上記のシアンイオン選択性電極を用いる方法は検出感度が高く (検出限界: 0.01ppm)、電極はマグネチックスタラ形のものであり、電極膜を常に最良の状態に維持するために自己洗浄機構が設けられ、タイマーにより予め設定された時間間隔で配管の洗浄が行われ、又繰り返し使用可能であるが、90% 応答での測定時間が約 15 分であり、従って適切な対応が遅れがちとなる点に課題があった。従って、本発明の目的は、測定感度が比較的低くとも、簡便なシアンセンサーを提供すると共に、極めて短時間で測定を完了し

得る実用的なシアンの測定システム及び測定法を提供することにある。

【0004】

【課題を解決し目的を達成する手段及び作用】本発明者等は微生物を用いたシアンセンサーの開発を念頭に入れ、これに適する微生物を調査した処、ブタベスト条約に基づく国際寄託当局であり、イギリス国・アバーディーン在 The National Collection of Industrial and Marine Bacteria Limited (NCIMB) に国際寄託されているシュードモナス・フルオレッセンス (*Pseudomonas fluorescens*) NCIMB 11764 が好気性条件下でシアンを資化する機能を有していることが判明した。そこで、当該微生物の分譲を受け、検討を進めた処、この微生物はシアンを生分解し、この際に呼吸活性が特異的に上昇すること、即ち酸素の消費が著しく高まることが確認され、本発明の目的に適する微生物であることが判明した。即ち、上記の微生物を固定化し、シアン化カリウム含有試料溶液を送ると、当該微生物の呼吸活性が上昇し、試料溶液中の溶存酸素が減少するので、この溶存酸素量の変化を調べれば試料溶液中のシアン濃度の測定が可能となるからであり、これにより発明の端緒を得た。

【0005】試料溶液中の溶存酸素量の変化は酸素電極を用いることにより検出することができるので、この線に沿って更に検討を進めた処、上記の微生物によるシアンの生分解に基づき酸素電極を流れる電流の減少変化応答は比較的早く数分程度であり且つ電流の減少変化量は試料溶液中のシアン濃度とほぼ直線関係を有することを見い出して本発明を完成するに至った。

【0006】従って、本発明によるシアンバイオセンサーはシュードモナス・フルオレッセンス NCIMB 11764 を固定化した担体が酸素電極と組み合わされていることを特徴としている。

【0007】微生物の固定には膜、例えばニトロセルロース膜を利用することも可能であるが、耐久性に若干の課題がありゲル、例えばアルギン酸カルシウムゲルを利用するのが有利であり、この場合には微生物担持ゲルをガラス管内に充填することによりユニット化することができる。

【0008】本発明によるシアン測定システムは、上記のシアンバイオセンサーと、該シアンバイオセンサーを一定の温度に保つ恒温槽と、シアンバイオセンサーにおける酸素電極の電流を測定する電圧電流計と、測定された電流変化を記録するレコーダとを備えていることを特徴としている。

【0009】更に、上記の測定システムを用いる本発明のシアン測定法は、シアンバイオセンサーにおける微生物固定化担体に一定温度の緩衝液を導くと共に酸素電極を流れる電流を測定し、電流値が安定した時点でシアンバイオセンサーに試料液を導いて電流を測定し、電流の減少の割合から試料液中のシアン濃度を測定することを

特徴としている。

【0010】本発明によるシアン測定システムにおいて、微生物を膜に固定させた場合には至適条件は約 30℃、pH 約 8 であり、ゲルに固定させたリアクタ型の場合には約 25℃、pH 約 9 であって、KCN 換算で共に 0.1 - 1.0ppm 迄シアン濃度と電流の減少量との間に直線性が得られた。

【0011】

【実施例】次に、添付図面を参照しつつ、本発明を更に詳細に且つ具体的に説明する。

#### 第 1 実施形

図 1 には本発明によるシアン測定システム 10 の概要が示されており、このシステム 10 はシアンバイオセンサー 12 (以下、単に「シアンセンサー」と称する) と、該シアンセンサーを一定の温度に保つ恒温槽 14 及びスターラ 16 と、電圧電流計 18 と、電流の変化を描記する機能を備えたレコーダ 20 とを具備している。上記のシアンセンサー 12 の基本構造は図 2 に示されている通りであり、酸素電極 121 と、シュードモナス・フルオレッセンス NCIMB 11764 の固定化されたニトロセルロース膜 123 とを具備している。酸素電極 121 は金属製シリンドラ 121a と、その内部に配置されたシリンドラ状のアルミニウム製陽極 121b と、該陽極の中心部に配置された線状のプラチナ製陰極 121c とを備えており、この陰極は上記の金属製シリンドラと電気的に接続している。酸素電極 121 の底部にはガス透過性を有し且つ液密のテフロン膜 125 が配置されており、又金属製シリンドラ 121a の内部とシリンドラ状のアルミニウム製陽極 121b との内部は酸素電極 121 の底部において連通しており、電解液 (塩化カリウム溶液) 121d で満たされている。微生物固定化膜 123 は透析膜 127 にて形成された窪み内に載置されている。尚、上記のテフロン膜 125 及び透析膜 127 はゴム製 O リング 129、129 により該リングとシアンセンサー 12 の外側シリンドラ (図 1 に略示) の内壁との間に固定配置されている。

【0012】次に、図 1 及び 2 に示されているシアン測定システムの操作について説明する。まず、微生物をニトロセルロース膜に固定すると共に、酸素電極 121 に電解液 121d を導入し、図示されているようにシアンセンサー 12 を組立てて恒温槽 14 内に設置し (この場合に、図 1 に示されているように、シアンセンサー 12 の外側シリンドラが恒温槽 14 の底壁と密着しないようにセットする)、酸素電極 121 を電源 (図示せず) に接続する。次いで、図 1 に矢印にて示されている導入口から恒温槽 14 に緩衝液 (図示せず) を導入する。電圧電流計 18 をモニターしながら電流値が安定するのを待つ。電流値が安定した後に、シアン含有試料溶液 (図示せず) を上記の緩衝液と同様に恒温槽 14 の内部空間に導く。この場合に、導入された試料溶液はシアンセンサー 12 の外側シリンドラと恒温槽 14 の底壁との間の隙間

及び透析膜 127 を経て微生物固定化膜 123 と接触するに至る (透析膜 127 が配置されているのは、試料溶液として現実には河川水が想定されており、浮遊物が付着して微生物固定化膜 123 の性能が低下するのを防止するためである)。シアンイオン含有試料溶液が微生物固定化膜 123 に接触すると、微生物はシアンを生分解し、その呼吸活性が特異的に高まるので試料溶液中の溶存酸素が低下し、これによって電圧電流計 18 の電流値に減少が生じ、その電流変化はレコーダ 20 に記録され、又チャートに自動描記される。電流の減少変化量は試料溶液中のシアン濃度に依存するので、標準試料溶液を使用して検量線を作成しておくことにより、濃度が未知の試料溶液中のシアン濃度を測定することができる。

#### 【0013】試験例 1

図 1 及び 2 に示されているシアン測定システムを使用し且つ各種濃度のシアン化カリウム (KCN) 溶液を試料溶液として電流変化を測定した。シュードモナス・フルオレッセンス NCIMB 11764 40mg をニトロセルロース膜に固定することにより微生物固定化膜とした。0.05M 磷酸緩衝液 (pH 8) を 30°C に加温して恒温槽内に導入した。導入から約 1 分後に電流値が安定したので、KCN 溶液 (0.1、0.3、0.5、0.7 又は 1.0ppm) を恒温槽内に導入して電流変化を測定した。レコーダの条件を抵抗 10KΩ、電圧 ±10mV、チャートスピード 160mm/hr に設定された。レコーダのチャートに描記された電流の減少を示す波形は図 3 に示される通りであった (但し、図 3 に示されている波形はチャートに描記されたものを模写したものであるが、拡大されている)。この図 3 からシアン濃度が高くなると電流の減少割合が大きくなることが判る。試料溶液中の KCN 濃度が最も高い 1.0ppm の場合にも、微生物がシアンを分解して呼吸活性の向上により試料溶液中の溶存酸素が消費され、その結果として電流が減少していた時間は 2 分間であり、本発明による測定法を実施する場合の所要時間は電流値安定化迄の約 1 分間を含めて約 3 分間であり、試料溶液の前処理も必要としないので、本発明による測定法は極めて有利であることが判明した。尚、KCN 濃度 (ppm) と電流の減少量 (μA) との関係をプロットした結果は図 4 に示されており、良好な直線性を有し、従って図 4 は標準検量線として使用することができる。

#### 【0014】第 2 実施形

図 1 及び 2 に示されているシアン測定システムを使用して測定試験を重ねた処、測定値に若干のバラツキのある事例が幾つか認められ、これについて検討した結果、微生物固定化膜の耐久性に起因することが判明した。そこで、更に検討の結果、リアクタ型とすることを決定し、種々の担体について調べた処、現状ではアルギン酸カルシウムゲルが良好であることが判明し、これに伴って図 5 に示されるシアン測定システムを構築した。図 5 のシアン測定システム 30 において、32 は試料溶液

321 を収容する磁気式スターラ付きボトルであり、34 はボトル 32 と同様の、但し緩衝液 341 を収容するボトルであり、36 は試料溶液及び緩衝液用の送液ポンプであり、38 はサーモスタット 381 を備えた恒温槽であり、40 は微生物固定化リアクタであり、42 はフローセル・タイプの酸素電極であり、44 は電圧電流計及び酸素電極 42 における電流を連続的に記録する機構を備えたレコーダであり、46 は配管 48 の遊端から排出する液を受ける廃液用ボトルである。微生物固定化リアクタ 40 はガラス製細管 401 と、該細管内に収容され且つシュードモナス・フルオレッセンス NCIMB 11764 をアルギン酸カルシウムゲルに担持させた固定化微生物 403 と、図示されていないが試料溶液 321 及び緩衝液 341 の送液の槽液に際し微生物固定化担体が流出しないように且つ試料溶液 321 中に場合により存在する浮遊物が微生物固定化担体に達しないように細管 401 の両端に配置された透水性詰め物を備えており、上記の細管 401 はゴム管 405、406 により配管 48 と接続されている。尚、このシアン測定システム 30 の操作は、送液ポンプ 36 の駆動により試料溶液 321 及び緩衝液 341 を送る以外は、図 1 及び 2 に示されている第 1 実施形の場合と基本的には同一であるので、説明を省略する。

#### 【0015】試験例 2

図 5 に示される通りのシアン測定システムを用いて且つ各種濃度のシアン化カリウム溶液を試料溶液として電流変化を測定した。即ち、先ず送液ポンプを駆動して緩衝液 (0.05M 磷酸緩衝液、pH 9.0) を 4.5ml/min の流速で移送し、25°C に保たれた恒温槽内に配置された微生物固定化リアクタ (微生物 40mg + アルギン酸カルシウムゲル、総容量 : 30ml) 並びに酸素電極を通過させ、電圧電流計にて電流値を測定し、電流値が定常状態に達した後に試料溶液であるシアン化カリウム溶液 (0.1、0.3、0.5、0.7 又は 1.0ppm) を送液して電流変化を測定した。KCN 濃度と電流の減少量との関係をプロットした結果は図 6 に示されている通りであり、良好な直線性を示し、従って本システムも KCN 換算で 0.1 - 1.0ppm 迄のシアン検出に用い得ることが判明した。尚、このシステムの場合も、測定所要時間は約 3 分間である。

#### 【0016】

【発明の効果】本発明によるシアン測定システムはシアンを資化、即ちシアンを生分解して呼吸活性が特異的に向上するシュードモナス・フルオレッセンス NCIMB 11764 を基本的センサー・エレメントとし、これと酸素電極とを組合せ、シアンの生分解に伴う電流変化からシアン濃度を測定する。その結果、KCN 換算で 0.1 - 1ppm のシアンを測定可能であり、測定所要時間は約 3 分間である。従って、河川水等を試料溶液として、ほぼリアルタイムのシアン測定が可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】本発明によるシアン測定システムの第 1 実施形の概要を示す図面である。

【図 2】シアンバイオセンサーの要部を示す縦断面図である。

【図 3】各種濃度のシアン化カリウムを試料溶液として用いた場合に、図 1 のシアン測定システムにおけるレコーダのチャートに自動描記された電流値の減少を示す波形を拡大して示した図面である。

【図 4】図 1 に示されるシステムを用いて測定された電流の減少量と試料溶液中のシアン化カリウム濃度との

【図 5】本発明によるシアン測定システムの第 2 実施形を示す略図である。

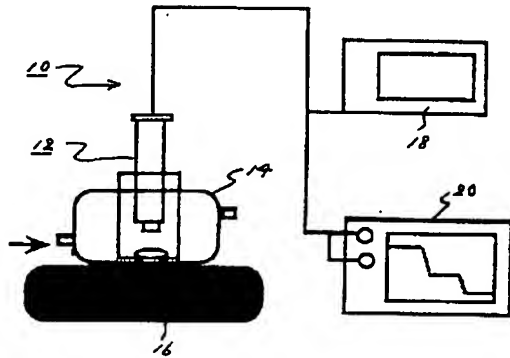
【図 6】図 5 に示されたシステムを用いて測定された \*

\* 電流の減少量と試料溶液中のシアン化カリウム濃度との関係を示すグラフである。

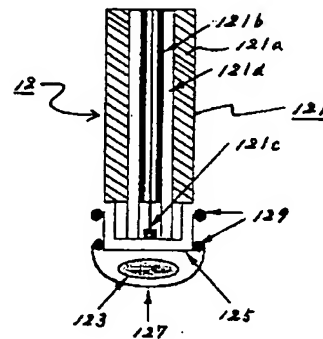
【符号の説明】

- 10, 30 : シアン測定システム、  
 12 : シアンバイオセンサー (シアンセンサー)、  
 123 : 微生物固定化膜、  
 121, 42 : 酸素電極  
 14, 38 : 恒温槽、  
 16 : スターラ、  
 18 : 電圧電流計、  
 20, 44 : レコーダ、  
 32 : 試料溶液収容ボトル、  
 34 : 緩衝液収容ボトル、  
 40 : 微生物固定化リアクタ。

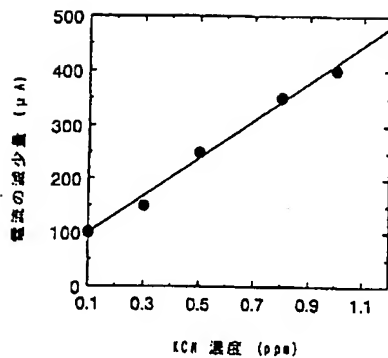
【図 1】



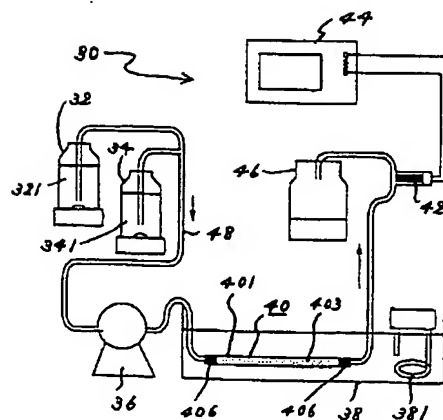
【図 2】



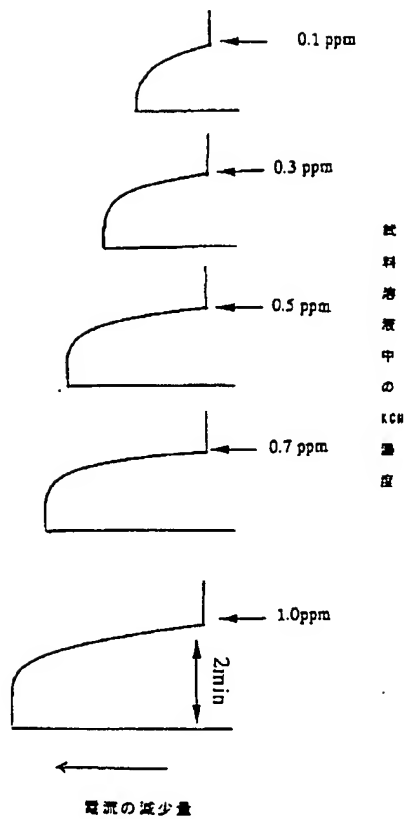
【図 4】



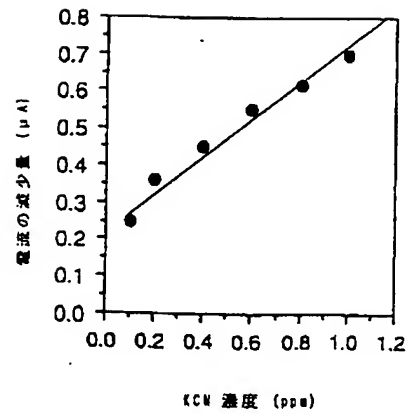
【図 5】



【図3】



【図6】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/02		6807-4B		
G 0 1 N 27/416				
// C 1 2 N 1/20	A	8828-4B		
(C 1 2 N 1/20				
C 1 2 R 1:39)				
(72)発明者 ▲あべ▼松 義弘			(72)発明者 軽部 征夫	
千葉県松戸市初富飛地7-1 建設省関東			神奈川県川崎市宮前区東有馬1-3-16	
技術事務所内			(72)発明者 山崎 久勝	
(72)発明者 望月 誠一			東京都港区虎ノ門1丁目11番7号 社団法人 建設電気技術協会内	
東京都千代田区大手町1丁目3番1号 建設省関東地方建設局内				

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-211011  
(43)Date of publication of application : 20.08.1996

---

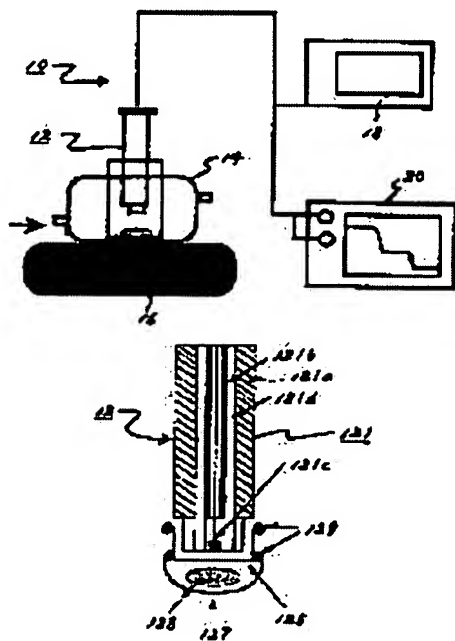
(51)Int.Cl. G01N 27/327  
  
C12M 1/34  
  
C12Q 1/00  
  
C12Q 1/02  
  
G01N 27/416  
  
// C12N 1/20  
  
(C12N 1/20  
  
C12R 1:39 )

---

(21)Application number : 07-001790 (71)Applicant : KENSETSU  
KANTO CHIHO  
KENSETSU  
KYOKUCHO  
KARUBE  
MASAO  
KENSETSU  
DENKI  
GIJUTSU  
KYOKAI  
(22)Date of filing : 10.01.1995 (72)Inventor : ABEMATSU  
YOSHIHIRO

MOCHIZUKI  
SEIICHI  
KARUBE  
MASAO  
YAMAZAKI  
HISAKATSU

#### (54) CYAN BIOSENSOR USING CYAN DECOMPOSING BACTERIA



#### (57) Abstract:

PURPOSE: To obtain a simple cyan biosensor adaptable even when measuring concn. is low by combining a carrier on which *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764 is immobilized with an oxygen electrode.

CONSTITUTION: Bacteria is immobilized on a nitrocellulose membrane 123 having *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764 immobilized thereon. At the same time, an electrolyte 121d is introduced into an oxygen

electrode 121 to assemble a cyan biosensor 12 which is, in turn, arranged in a thermostatic tank 14 and the electrode 121 is connected to a power supply and a buffer soln. is introduced into a tank 14 from an introducing port. A voltage ammeter 18 is monitored and, after a current value is stabilized, a cyan-containing sample soln. is guided into the tank 14 in the same way. The sample soln. passes through the gap between the sensor 12 and the bottom wall of an outside cylinder tank 16 and a dialytic membrane 127 to come into contact with the membrane 123 having bacteria immobilized thereon. Cyan is biologically decomposed by bacteria and the dissolved oxygen in the sample soln. lowers and the current value of the ammeter 18 is reduced. Since this current change quantity relies on the



concn. of cyan, the concn. of cyan can be measured from a already formed calibration curve.

---

#### LEGAL STATUS

[Date of request for  
examination]

[Date of sending the examiner's  
decision of rejection]

[Kind of final disposal of  
application other than the  
examiner's decision of  
rejection or application  
converted registration]

[Date of final disposal for  
application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against  
examiner's decision of  
rejection]

[Date of requesting appeal  
against examiner's decision of  
rejection]

[Date of extinction of right]

---

#### CLAIMS

---

[Claim(s)]

[Claim 1] *Pseudomonas fluorescens* (*Pseudomonas fluorescens*)  
NCIMB 11764 Cyanogen biosensor characterized by combining the  
fixed support with the oxygen electrode.

[Claim 2] *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764 Claim which is

fixed to support and characterized by filling up in a glass tube  
1 Cyanogen biosensor of a publication.

[Claim 3] claim characterized by support being  
calcium-alginate gel 1 or -- 2 Cyanogen biosensor of a  
publication.

[Claim 4] Claim 1 Cyanogen gaging system characterized by  
having the thermostat which maintains the cyanogen biosensor  
and this cyanogen biosensor of a publication at fixed  
temperature, the voltameter which measures the current of the  
oxygen electrode in a cyanogen biosensor, and the recorder  
which records measured current change.

[Claim 5] Claim 1 Pseudomonas fluorescens in the cyanogen  
biosensor of a publication NCIMB 11764 Measuring method of  
cyanogen characterized by measuring the current which leads a  
sample solution to a biotechnology cyanogen sensor, and flows  
an oxygen electrode when the current which flows an oxygen  
electrode is measured and a current value is stabilized, while  
leading the buffer solution of constant temperature to the  
fixed support, and measuring the cyanogen concentration in a  
sample solution from the degree of reduction in a current.

---

#### DETAILED DESCRIPTION

---

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] This invention is used in order to  
measure the cyanogen concentration dissolved in this sample  
solution for the sample solution which started the measuring  
method and gaging system of cyanogen using the cyanogen  
biosensor and this sensor which use a cyanogen decomposition  
microorganism, for example, was extracted from the river etc.  
by potassium-cyanide concentration conversion.

[0002]

[Description of the Prior Art] Since cyanogen is a deadly poison,  
various approaches are proposed as the detecting method.

Generally the cyanide in the sample solution is cyanide ion. (CN-) Since it is intermingled as a cyanogen complex with which stability differs, there is the need of pretreating. That is, it sets to pH 5.5. Zn<sup>2+</sup> (CH<sub>3</sub>COO) It generates under existence. HCN Sample solution pH Acetic acid 5.5 It is distillation after making. HCN It pretreats by making it dissociate. pH 5.0 It generates. HCN Sample water pH 5.0 It adjusts and is 40 degrees C. It generates through air by warming. HCN NaOH It pretreats by carrying out uptake. pH 2 It generates below. HCN It is called the total cyanide and this is the sample solution. H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> It adds. pH 2 The following, nothing, and EDTA It generates by adding and carrying out heating distillation. HCN NaOH It pretreats by carrying out uptake. inside of the sample solution pretreated as mentioned above CN- the usually and pyrazolone method -- moreover -- A quantum is carried out by the quick pyrazolone method. Setting to such assays, the former is Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Buffer solution, Chloramine As T and a color reagent The mixed solution of 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone and a screw (1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone) etc. is added in the pretreated sample water of a constant rate. Wavelength 620nm It is that to which an absorbance is measured near and the latter also performs the same actuation as the former. However, it is a color reagent. 4-pyridinecarboxylic acid-pyrazolone solution (mixture of N,N-dimethylformamide solution of 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone, and a 4-pyridinecarboxylic acid water solution) It uses and is wavelength. 638nm It is what measures an absorbance near. It is. In addition, sample water after pretreatment pH 12-13 There is also an ion electrode method adjusted and measured. moreover -- CN- Case [ many / comparatively ] of an amount (three to 11.0 ppm) \*\*\*\* -- pH 9-10 it is -- luminol (3-amino phthalic-acid hydrazide) Copper to contain (II) If the cyanide ion content sample of the above-mentioned concentration is added into an ammine reagent Copper (II) A good sleep complex is copper. (I) It changes to cyanogen complex ion and a solution changes with these from a blue color to colorlessness. Within a thermostat

If it adds and passes through hydrogen-peroxide liquid in the above-mentioned solution and the time is started t A solution changes to a blue color again in a second. In this case Cyanide ion concentration, Time amount until it becomes a blue color again (induction period) The so-called chronometric analysis method for performing the quantum of cyanide ion using there being linear relation is also between logarithms. In addition, in order to raise detection sensitivity, there is also a method of using a cyanide ion selectivity electrode as a sensor. In order to detect cyanogen using this electrode Since the cyanide which flowed into the river is generally making the gestalt of a cyanogen complex in many cases Ultraviolet rays are irradiated and a cyanogen complex is disassembled into the extracted sample solution. HCN Nothing, It leads to the above-mentioned cyanide ion selectivity electrode with the gestalt of the gas which removed the sulfide ion which leads to a gas transparency column and a lead peroxide column, and serves as the measurement interfering substance, and changes into a current and a voltage signal, and while recording this, cyanide ion concentration is measured.

[0003]

[Object of the Invention thru/or the purpose of invention] Although the above-mentioned general conventional cyanogen detecting method is detection sensitivity comparison-fitness (limit of detection of the pyrazolone method :0.03ppm) Complicated pretreatment was required and the technical problem was in the point that the measurement after pretreatment itself takes time amount further. the approach using the above-mentioned cyanide ion selectivity electrode on the other hand -- detection sensitivity -- high -- (limit of detection :0.01ppm) Although it is the thing of a magnetic stirrer form, and a self-soaping-machine style is prepared, and washing of piping is performed with the time interval beforehand set up by the timer and the electrode is repeatedly usable in order to always maintain an electrode layer in the best condition 90% The measuring time in a response is

abbreviation. 15 It is a part, therefore the technical problem was in the point it becomes behind suitable corresponding. Therefore, the purpose of this invention is to offer the gaging system and measuring method of practical cyanogen which can complete measurement extremely in a short time while offering a simple cyanogen sensor as sensitometry is comparatively low.  
[0004]

[The means and operation] which solve a technical problem and attain the purpose The place which investigated the microorganism which this invention person etc. puts in bearing in mind development of the cyanogen sensor which used the microorganism, and is suitable for this, He is the international depositary authority based on the Buta Best treaty. The British country and ABADIN \*\* The National Collection of Industrial and Marine Bacteria Limited (NCIMB) *Pseudomonas fluorescens* by which international deposition is carried out (*Pseudomonas fluorescens*) NCIMB 11764 Under aerobic conditions, cyanogen It became clear that it had the function which carries out utilization. Then, sale in lots of the microorganism concerned were received, the place which advanced examination, and this microorganism biodegraded cyanogen, it was checked that respiratory activity goes up specifically in this case, i.e., consumption of oxygen increases remarkably, and it became clear that it was a microorganism suitable for the purpose of this invention. That is, since the respiratory activity of the microorganism concerned went up and the dissolved oxygen in the sample solution decreased when the above-mentioned microorganism was fixed and the potassium-cyanide content sample solution was sent, it is because measurement of the cyanogen concentration in the sample solution will be attained if change of this amount of dissolved oxygen is investigated, and this acquired the start of invention.

[0005] Since change of the amount of dissolved oxygen in the sample solution was detectable by using an oxygen electrode, the reduction change response of the place which advanced

examination further along with this line, and the current which flows an oxygen electrode based on the biodegradation of the cyanogen by the above-mentioned microorganism was about several minutes early comparatively, and the reduction variation of a current finds out having linear relation mostly with the cyanogen concentration in the sample solution, and came to complete this invention.

[0006] Therefore, the cyanogen biosensor by this invention is *Pseudomonas fluorescens*. NCIMB 11764 It is characterized by combining the fixed support with the oxygen electrode.

[0007] Although it is also possible to use the film, for example, a nitrocellulose membrane, for immobilization of a microorganism, it is advantageous for some technical problem to be in endurance and to use gel, for example, calcium-alginate gel, and unitization can be carried out by being filled up with microorganism support gel in a glass tube in this case.

[0008] The cyanogen gaging system by this invention is characterized by having the thermostat which maintains an above-mentioned cyanogen biosensor and this above-mentioned cyanogen biosensor at fixed temperature, the voltameter which measures the current of the oxygen electrode in a cyanogen biosensor, and the recorder which records measured current change.

[0009] Furthermore, the cyanogen measuring method of this invention using the above-mentioned gaging system is characterized by leading a sample solution to a cyanogen biosensor, measuring a current, when the current which flows an oxygen electrode is measured and a current value is stabilized, while leading the buffer solution of constant temperature to the microorganism immobilization support in a cyanogen biosensor, and measuring the cyanogen concentration in a sample solution from the degree of reduction in a current.

[0010] in the cyanogen gaging system by this invention, when a microorganism was made to fix to the film, as for optimal conditions, linearity was acquired between cyanogen concentration and the decrement of a current to abbreviation .

30 degrees C and pH Abbreviation 8 it is -- the case of the reactor mold made to fix to gel -- abbreviation 25 degrees C and pH Abbreviation 9 it is -- KCN conversion -- both -- 0.1 to 1.0 ppm

[0011]

[Example] Next, this invention is explained still in detail and concretely, referring to an accompanying drawing.

\*\* [ ] -- cyanogen biosensor [ ] -- 12 (a "cyanogen sensor" is only called hereafter), thermostat 14 which maintains this cyanogen sensor at fixed temperature and stirrer 16, voltameter 18, and recorder 20 [ equipped with the function which carries out the registration of the change of a current ] are provided.

1 Operation form Fig. 1 \*\*\*\* -- cyanogen gaging system by this invention 10 an outline shows -- having -- \*\*\*\* -- this system

10 Above-mentioned cyanogen sensor 12 Basic structure is drawing. 2 It is as being shown and is an oxygen electrode. 121 Pseudomonas fluorescens NCIMB 11764 Fixed nitrocellulose membrane 123 It provides. Oxygen electrode 121 Metal cylinder 121a Anode plate made from aluminum of the shape of a cylinder arranged to that interior 121b Linear cathode made from platinum arranged in the core of this anode plate 121c It has and this cathode is electrically connected with the above-mentioned metal cylinder. oxygen electrode 121 a pars basilaris ossis occipitalis -- gas permeability -- having -- and liquid -- dense Teflon membrane 125 it arranges -- having -- \*\*\*\* -- moreover, metal cylinder 121a The interior, and cylinder-like anode plate made from aluminum 121b the interior -- oxygen electrode 121 a pars basilaris ossis occipitalis -- setting -- open for free passage -- \*\*\*\* -- the electrolytic solution (potassium chloride solution) 121 d It is filled. Microorganism fixed film 123 Permeable membrane 127 It is laid in the formed hollow. In addition, above-mentioned Teflon membrane 125 And permeable membrane 127 Product made of rubber O Ring 129 129 This ring Cyanogen sensor 12 Outside cylinder (drawing 1 sketch) It is placed in a fixed position between walls.

[0012] Next, drawing 1 It reaches. 2 Actuation of the cyanogen gaging system shown is explained. First, it is an oxygen electrode while fixing a microorganism to a nitrocellulose membrane. 121 Electrolytic solution 121d It introduces. it is illustrated -- as -- cyanogen sensor (in this case, drawing -- as shown in 1) 12 assembling -- thermostat 14 inside -- installing -- Cyanogen sensor The outside cylinder of 12 is a thermostat. 14 Oxygen electrode 121 set so that it may not stick with a bottom wall Power source (not shown) It connects. Subsequently, drawing 1 From the inlet shown by the arrow head to a thermostat 14 Buffer solution (not shown) It introduces. Voltmeter 18 It waits to stabilize a current value, acting as a monitor. After a current value is stabilized, it is the cyanogen content sample solution. (not shown) It is a thermostat as well as the above-mentioned buffer solution. 14 It leads to a building envelope. In this case, the introduced sample solution is a cyanogen sensor. (permeable membrane that 127 is arranged) 12 Outside cylinder and thermostat 14 The clearance and permeable membrane between bottom walls It passes through 127 and is the microorganism fixed film. 123 It comes to contact. River water is actually assumed as the sample solution, suspended matter adheres, and it is the microorganism fixed film. 123 It is for preventing that the engine performance falls. The cyanide ion content sample solution is the microorganism fixed film. 123 When it contacts, cyanogen is biodegraded, since the respiratory activity increases specifically, the dissolved oxygen in the sample solution falls, and a microorganism is a voltmeter by this. 18 Reduction arises in a current value and the current change is a recorder. 20 It is recorded and the automatic registration is carried out to a chart. Since the reduction variation of a current is dependent on the cyanogen concentration in the sample solution, the cyanogen concentration in the sample solution with strange concentration can be measured by creating the calibration curve using the standard sample solution.

[0013] Example of a trial 1 Fig. 1 It reaches. 2 The cyanogen



gaging system shown is used and it is the potassium cyanide of various concentration. (KCN) Current change was measured by making a solution into the sample solution. *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764 40mg It considered as the microorganism fixed film by fixing to a nitrocellulose membrane. 0.05M Phosphate buffer (pH 8) 30 degrees C It warmed and introduced in the thermostat. From installation to abbreviation 1 Since the current value was stabilized after the part, it is KCN. Solution (0. 1, 0.3, 0. 5, 0.7, or 1.0 ppm) It introduced in the thermostat and current change was measured. The conditions of a recorder are resisted. 10Kohm, electrical potential difference \*\*10mV and chart speed 160 mm/hr It was set up. the wave which shows reduction of a current by which the registration was carried out to the chart of a recorder -- drawing 3 It was as being shown. (however, drawing -- although the wave shown in 3 copies that by which the registration was carried out to the chart, it is expanded) . this drawing 3 from -- when cyanogen concentration becomes high, it turns out that the reduction degree of a current becomes large. Inside of the sample solution KCN 1.0 ppm with the highest concentration Also to a case A microorganism decomposes cyanogen and the dissolved oxygen in the sample solution is consumed by improvement in respiratory activity. Time amount to which the current was decreasing as the result 2 The duration in the case of being between parts and enforcing the measuring method by this invention is the abbreviation to current value stabilization. For 1 minute is included and it is abbreviation. 3 Since it is between parts and pretreatment of the sample solution is not needed, either It became clear that the measuring method by this invention is very advantageous. In addition, KCN Concentration (ppm) Decrement of a current ( $\mu$ A) The result of having plotted relation is drawing 4. It is shown, and has good linearity, therefore is drawing. 4 It can be used as a standard calibration curve.

[0014] \*\* 2 Operation form Fig. 1 It reaches. 2 As a result of accepting some places which repeated the measurement trial

using the cyanogen gaging system shown, and examples which have the variation in some in measured value and examining this, it became clear that it originated in the endurance of the microorganism fixed film. Then, further, as a result of examination, in the place and the present condition of having determined considering as a reactor mold and having investigated it about various support, it becomes clear that calcium-alginate gel is good, and it follows on this, and is drawing. 5 The cyanogen gaging system shown was built. Drawing 5 Cyanogen gaging system 30 It sets and is 32. Sample solution 321 It is the bottle with a magnetic type stirrer to hold. 34 Bottle 32 It is the same, however the buffer solution. 341 It is the bottle to hold. 36 It is a liquid-sending pump for the sample solution and the buffer solutions, and is 38. Thermostat 381 It is the thermostat which it had. 40 It is a microorganism fixed reactor and is 42. It is a flow cell type oxygen electrode, and is 44. A voltameter and oxygen electrode 42 It is the recorder equipped with the device which records continuously the current which can be set, and is 46. Piping 48 It is the bottle for waste fluid which receives the liquid discharged from a free end. microorganism fixed reactor 40 Glass capillary 401 it holds in this capillary -- having -- and *Pseudomonas fluorescens* NCIBM 11764 Immobilized microorganism which calcium-alginate gel was made to support 403 It is the sample solution although not illustrated. 321 And the buffer solution 341 So that microorganism immobilization support may not flow out on the occasion of the intracisternal solution of liquid sending And the sample solution 321 It is a capillary so that the suspended matter which exists by the case in inside may not reach microorganism immobilization support. 401 It has permeable padding arranged to both ends, and is the above-mentioned capillary. 401 Rubber tube 405 406 Piping 48 It connects. In addition, this cyanogen gaging system 30 Actuation is a liquid-sending pump. 36 It is the sample solution by drive. 321 And the buffer solution 341 Except sending, it is drawing. 1 It reaches. 2 \*\* shown 1 Since it is fundamentally

[ as the case of an operation form ] the same, explanation is omitted.

[0015] Example of a trial 2 Figs. 5 Current change was measured by making the potassium-cyanide solution of various concentration into the sample solution, using a cyanogen gaging system as shown. namely, -- first -- a liquid-sending pump -- driving -- the buffer solution (0.05M phosphate buffer --) pH 9.0 (microorganism [ ] -- 40mg+ calcium-alginate gel --) 4.5 ml/min the rate of flow -- transporting -- 25 degrees C Microorganism fixed reactor arranged in the maintained thermostat The total capacity : 30ml Potassium-cyanide solution which is the sample solution after making a list pass an oxygen electrode, measuring a current value with a voltameter and a current value's reaching a steady state (0.1, 0.3, 0.5, 0.7, or 1.0 ppm) The liquid was sent and current change was measured. KCN the result of having plotted the relation between concentration and the decrement of a current -- drawing 6 as being shown -- it is -- good linearity -- being shown -- therefore, this system KCN Conversion 0.1 to 1.0 ppm up to -- it became clear that it could use for cyanogen detection. In addition, also for the case of this system, a measurement duration is abbreviation. 3 It is between parts.

[0016]

[Effect of the Invention] The cyanogen gaging system by this invention is *Pseudomonas fluorescens* whose respiratory activity biodegrades utilization, i.e., cyanogen, and improves cyanogen specifically. NCIMB 11764 It considers as a fundamental sensor element and cyanogen concentration is measured from the current change accompanying the biodegradation of combination and cyanogen for this and an oxygen electrode. Consequently, KCN By conversion 0.1 to 1 ppm It is measurable in cyanogen and a measurement duration is abbreviation. 3 It is between parts. Therefore, cyanogen measurement of real time is almost attained by making river water etc. into the sample solution.

---

## DESCRIPTION OF DRAWINGS

---

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] \*\* of the cyanogen gaging system by this invention  
1 It is the drawing in which the outline of an operation form is shown.

[Drawing 2] It is drawing of longitudinal section showing the important section of a cyanogen biosensor.

[Drawing 3] It is drawing when the potassium cyanide of various concentration is used as the sample solution. 1 It is the drawing in which the wave which shows reduction of a current value by which the automatic registration was carried out to the chart of the recorder in a cyanogen gaging system was expanded and shown.

[Drawing 4] Drawing 1 It is the graph which shows the relation between the decrement of the current measured using the system shown, and the potassium-cyanide concentration in the sample solution.

[Drawing 5] \*\* of the cyanogen gaging system by this invention  
2 It is the schematic drawing showing an operation form.

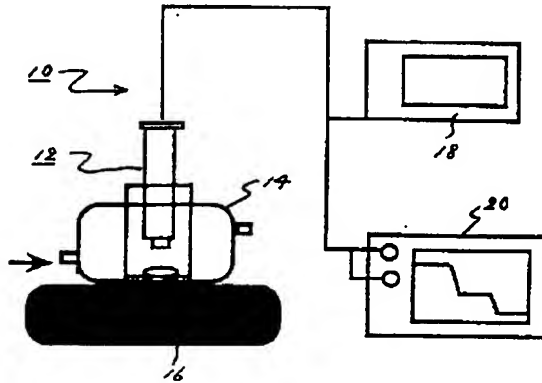
[Drawing 6] Drawing 5 It is the graph which shows the relation between the decrement of the current measured using the shown system, and the potassium-cyanide concentration in the sample solution.

[Description of Notations]

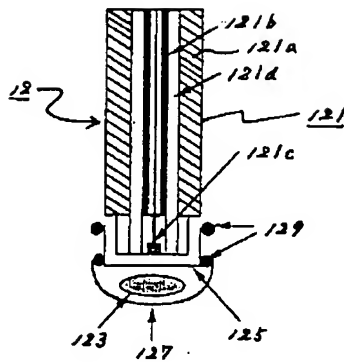
10 30 : Cyanogen gaging system,  
12 : Cyanogen Biosensor (Cyanogen Sensor) \*\*  
123 : Microorganism Fixed Film,  
121 42 : Oxygen electrode  
14 38 : Thermostat,  
16 : Stirrer,  
18 : Voltameter,  
20 44 : Recorder,  
32 : Sample-Solution Hold Bottle,  
34 : Buffer-Solution Hold Bottle,

40 : Microorganism fixed reactor.

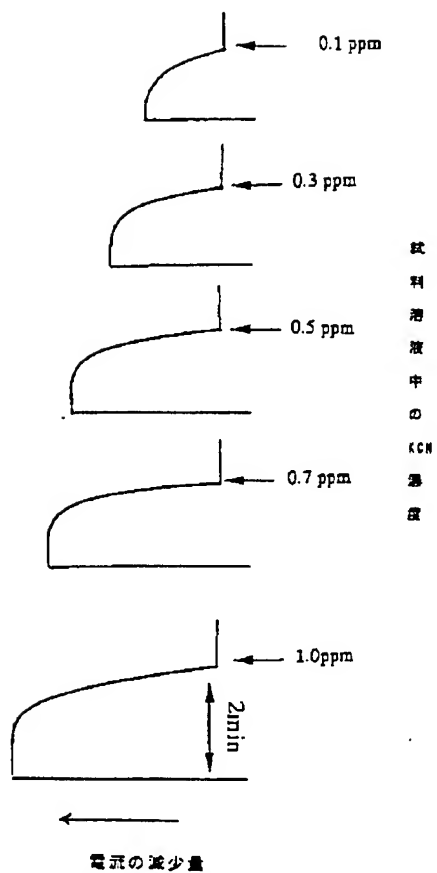
Drawing 1



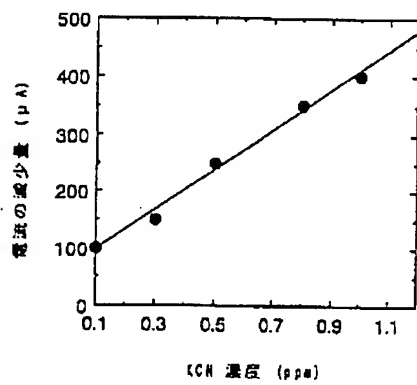
Drawing 2



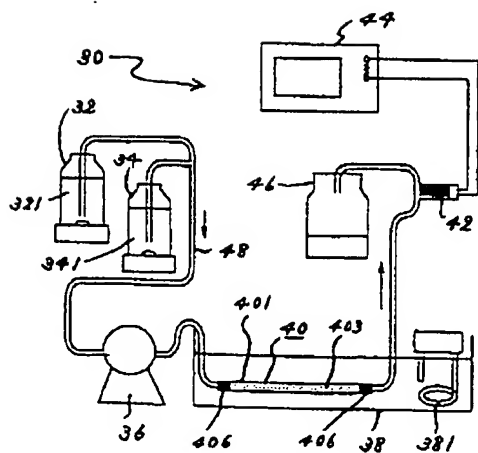
Drawing 3



Drawing 4



Drawing 5



Drawing 6

